

تأثیر حشره‌کش‌های پیریمیکارب و تیامتوکسام بر فعالیت آنزیم‌های سم- زدای شته سیاه باقلا

Effect of Pirimicarb and Thiamethoxam on detoxification enzyme activity in the black bean aphid, *Aphis fabae* Scopoli (Hem: Aphididae)

شیمای رحمانی^{۱*}، علیرضا بندانی^۲، سولماز عظیمی^۳

Shima Rahmani^{1*}, Ali R. Bandani², Solmaz Azimi³

- ۱- عضو هیئت علمی گروه حشره شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- عضو هیئت علمی گروه گیاه پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج.
۳- عضو هیئت علمی گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز.

1- Department of Entomology, Science and reaserch branch,

Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Plant Protection Dept., College of Agriculture and Natural Resources,

University of Tehran, Karaj, Iran.

3-Department of Plant Protection,

Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz. Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shrahmani@srbiau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۹)

چکیده

در بسیاری از موجودات زنده، آنزیم‌های سم‌زدا نقش مهمی در سم‌زدایی ترکیبات ناگوارد ایفا می‌کنند و به عنوان نشانگرهای زیستی قرارگیری در معرض ترکیبات ناگوارد قلمداد می‌شوند. در واقع، درجات مختلف حساسیت به ترکیبات شیمیایی ممکن است به دلیل تفاوت‌های بیوشیمیایی در سم‌زدایی حشره‌کش‌ها باشد. در بررسی پیش‌رو، اثر تیامتوکسام و پیریمیکارب در غلظت‌های زیرکشنده بر میزان فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا شته سیاه باقلا، *Aphis fabae* Scopoli (Hemiptera: Aphididae) مورد ارزیابی قرار گرفته است. به منظور تعیین اثرات کشنده در شرایط آزمایشگاهی، غلظت میانه کشنده برای شته در معرض تیامتوکسام و پیریمیکارب به ترتیب $۱۱۳/۸۵$ و $۶۸/۹۴$ (۶۸/۹۴-۶۲۵/۱۶) و $۲/۹۴$ mg(ai)L^{-1} (۱/۳-۷۱/۹۹) محاسبه شد. هم‌چنین فعالیت مونواکسیژنازها به عنوان آنزیم‌های سم‌زدا اندازه‌گیری شد. تأثیر هر دو حشره‌کش بر شته *A. fabae* باعث افزایشی معنی‌دار در القای آنزیم‌های مونواکسیژناز شد ($P<۰/۰۰۰۱$). در این بررسی فعالیت گلوکوتانیون-اس-ترانسفراز (GST) به موازات افزایش غلظت‌های زیرکشنده پیریمیکارب القا می‌شود ($P=۰/۰۰۰۱$ ، $F=۱۸/۱۷$ ، $df=۵$ ، ۱۲). تیامتوکسام نیز در غلظت‌های بالاتر ($۴۸/۰۷$ ، $۷۵/۰۶$ و $۱۱۳/۸۵$ mg (ai)/L) فعالیت این آنزیم را القا کرد ($P=۰/۰۰۰۹$ ، $F=۱۸/۱۷$ ، $df=۵$ ، ۱۲). نتایج نشان داد که در غلظت‌های زیرکشنده می‌توان دو شته‌کش مهم تیامتوکسام و پیریمیکارب را توسط آنزیم‌های سم‌زدا به عنوان نشانگرهای بیوشیمیایی شناسایی کرد.

واژه‌های کلیدی

Aphis fabae

پیریمیکارب،

تیامتوکسام،

آنزیم‌های سم‌زدا،

نشانگرهای زیستی.

مقدمه

شته سیاه باقلا، (*Aphis fabae* Scopoli (Hemiptera: Aphididae)، در تمامی مناطق ایران از جمله سواحل شمالی کشور و شهرستان‌های مرکزی و اطراف تهران انتشار دارد (Esmaili et al. 1998؛ Khanjani, 2004). این شته از مهم‌ترین آفاتی است که در دنیا بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی میزبان دارد و باعث خسارت به گیاهان میزبان به ویژه گونه‌هایی از دو خانواده Chenopodiaceae و Fabaceae می‌شود (CAB International 2000). شته سیاه باقلا از نظر انتقال بیماری‌های ویروسی نظیر ویروس موزاییک و زردی چغندر قند نیز اهمیت دارد و گاهی خسارت از این لحاظ قابل توجه است (Esmaili et al. 1998؛ Khanjani, 2004). کنترل شته‌ها بیشتر مبتنی بر استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی است. سموم شیمیایی که در کنترل شته‌ها استفاده می‌شود باعث آلودگی‌های زیست محیطی و اثرات مخرب بر سایر موجودات زنده می‌شوند (Hasanshai et al. 2016).

تغییرات فیزیولوژیک، بیوشیمی و بافت شناسی به منظور تخمین تأثیر پذیری موجودات زنده از مواد شیمیایی و آلاینده‌های محیط زیست اهمیت روزافزون یافته است. این تغییرات با استفاده از نشانگرهای زیستی که نشان‌گر این تغییرات هستند، شناسایی می‌شوند. به علت این‌که غلظت برخی آلاینده‌ها برای ردیابی و شناسایی بسیار پایین است لذا برای شناسایی اثرات این آلاینده‌ها بر موجودات زنده از نشانگرها استفاده می‌کنند. آنزیم‌های سم‌زدا مانند آنزیم‌های مونواکسیژناز P₄₅₀ و گلوکاتایون ترانسفراز نمونه‌ای از نشانگرهای زیستی پروتئینی می‌باشند. این آنزیم‌ها در سم‌زدایی و بیوترانسفر ماسیون مواد شیمیایی آلی دخالت دارند (Hyne and Maher, 2003). در بسیاری از موارد، بررسی‌های نشانگرهای بیوشیمیایی بر موجودات زنده در معرض مواد سمی منتخب در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی انجام می‌گیرد. این مطالعات آزمایشگاهی با نتایجی که در پی دارند، می‌توانند

در پیش بینی اثرات آلودگی بر جمعیت‌های طبیعی در مزرعه راه‌گشا باشند (Hayes and Pulford, 2003).

از دیرباز، اثرات آفت‌کش‌ها و سایر مواد سمی بر موجودات زنده با استفاده از پارامترهای ساده شده‌ای برای تعیین اثر، مانند LC₅₀ یا LD₅₀ (دز یا غلظتی که باعث مرگ ۵۰ درصد افراد یک جمعیت می‌شود) ارزیابی می‌شوند. ارزیابی‌های غلظت کشنده، تخمین و مقایسه سریع چندین ماده سمی را با توجه به اثر آن‌ها بر افراد یک گونه خاص امکان‌پذیر می‌سازد. هم‌چنین تخمین LC₅₀ از این راه برای گونه‌های هدف و غیرهدف نسبتاً ارزان است (Stark et al. 2007). به منظور طراحی زیست‌سنجی‌ها که اثرات آفت‌کش‌ها را بر موجود زنده ارزیابی می‌کنند برخی موارد مهم شامل گونه، مرحله زندگی جنس‌ها، راه‌های ورود آفت‌کش، پارامترهای تاریخچه زیستی، اندازه پلات مزرعه و فرمولاسیون‌های آفت کش باید در نظر گرفته شوند (Ruberson, 1998).

آنزیم‌های مونواکسیژناز P₄₅₀ و گلوکاتایون ترانسفراز به عنوان آنزیم‌های سم‌زدا نقش اصلی را در سم‌زدایی سموم کارباماتی و نیکوتینوئیدی دارند (Basij et al. 2016؛ Sulaiman et al. 2016). پیریمیکارب یک حشره‌کش دی متیل‌کاربامات است که علیه شته‌ها و سفید بالک‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Syngenta, 2004). تیمتوکسام نیز از جمله حشره‌کش‌های نئونیکوتینوئیدی است که در داخل و خارج از گلخانه برای مدیریت حشرات مکنده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Cloyd and Bethke, 2011). پیریمیکارب و حشره‌کش‌های نئونیکوتینوئیدی اگرچه برای گرده افشان‌ها خطرناک هستند (Sanchez-Bayo and Goka, 2014)، اما شته‌کش‌های مناسبی به شمار می‌روند و در عین حال برای بسیاری از دشمنان طبیعی شته‌ها بی‌زیان هستند (Jalali et al. 2009).

گلوکاتایون اس-ترانسفرازها (EC 2.5.1.18, GSTs) آنزیم‌های سم‌زدای فاز دو در بیشتر موجودات زنده هستند.

سیستم آنزیمی مونواکسیژنازها و گلوکاتایون اس- ترانسفرازهای شته سیاه باقلا مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت باقلا

بذر گیاهان باقلا (*Faba vulgaris*) به طور منظم، دو بار در هفته، در گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک اره کاشته می‌شدند. خاک اره علاوه بر وزن سبک، که حمل و نقل گلدان‌ها را آسان می‌سازد، از شیوع آلودگی قارچی به ویژه ریزوکتونیا و فوزاریوم جلوگیری می‌کند و پوشش مناسبی برای انجام عمل تهویه و نگهداری رطوبت بوده و جایگزین مناسبی برای خاک محسوب می‌شود. بذرهای باقلا که پیش از کاشت به منظور تسریع در جوانه زنی، به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در آب خیس خورده بودند، به تعداد ۱۰ تا ۱۲ عدد در سطح خاک اره‌ای که به ارتفاع ۱۰ تا ۱۵ سانتی متری از کف گلدان ریخته می‌شد، قرار داده می‌شدند. نهایتاً روی بذرهای با مقداری دیگر خاک اره پوشانیده می‌شد. گیاهان (در شرایط گلخانه با دمای $25 \pm 5^\circ\text{C}$ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی $50 \pm 20\%$ درصد) یک روز در میان آبیاری می‌شدند و برای جبران کمبود مواد غذایی، هر چهار روز یک بار کود کامل هورتی-گرو (N:K:P:Mg: ۲۰:۲۰:۲۰:۲۰ درصد؛ تولید هورتی‌لند، هلند) به نسبت یک و نیم تا سه گرم در لیتر به گیاهان داده می‌شد. دو هفته بعد از شروع کاشت، زمانی که گیاهان به ارتفاع حدود ۱۲ سانتی متری می‌رسیدند، به اتاق رشد منتقل می‌شدند تا توسط شته‌ها آلوده شوند.

پرورش شته سیاه باقلا

جمعیت اولیه شته سیاه باقلا، (*Aphis fabae* Scopoli (Hemiptera: Aphididae) متعلق به آزمایشگاه مدیریت تلفیقی آفات (IPM) واقع در ساختمان موزه جانورشناسی دانشکده کشاورزی کرج، دانشگاه تهران، بود که در شرایط جدید روی گیاهان باقلا در اتاقک رشد، با دمای $23 \pm 1^\circ\text{C}$ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی $70 \pm 10\%$

(Hayes and Pulford, 1995). این آنزیم‌ها در سم‌زدایی برخی گروه‌های حشره‌کش‌های شیمیایی مانند ارگانوفسفره‌ها، پایروتروئیدها، کاربامات‌ها و هیدروکربن-های کلره مانند DDT دخالت دارند (Ronson et al. 2001) و در مقاومت به حشره‌کش‌ها از طریق متابولیسم مستقیم حشره‌کش (Wei et al. 2001)، تفرق (Sequestration) (Balabaskaran et al. 1989) یا با حفاظت در برابر اثرات سمی ثانویه مانند افزایش در پروکسیداسیون لیپید، القا شده با حشره‌کش درگیر هستند (Vontas et al. 2001).

دخالت گلوکاتایون اس-ترانسفرازها در متابولیسم حشره-کش‌ها از مگس خانگی، کنه شکارگر *Neoseiulus fallacis* (Mullin et al. 1982)، لارو *Heliothis virescens* (Bull and Whitten, 1972) و سوسک آرد، *Tribolium castaneum* (Wool et al. 1982) گزارش شده است. نقش گلوکاتایون اس-ترانسفرازها هم‌چنین در *Plutella xylostella* ضمن توسعه مقاومت به ارگانوفسفره‌ها به خوبی مشخص شده است (et al. 1989; Ho, 1966; Balabaskaran). از سوی دیگر، P_{450} ها گروه متنوعی از آنزیم‌ها با عملکردهای بسیار با طیفی گسترده از بیوسنتز تا متابولیسم زنبوبوتیک‌ها هستند. تعداد ژن‌های P_{450} در ژنوم حشره، از ۴۶ تا بیش از ۱۵۰ عدد متغیر است که هر یک، کدکننده یک آنزیم ویژه از P_{450} هستند (Feyereisen, 2006; Nelson, 2006). افزایش بیان سیتوکروم P_{450} ها دلیل عمده مقاومت به حشره‌کش‌ها در گونه‌هایی از حشرات مهم از نظر تجاری بوده است (Opennorth, 1985).

در این بررسی، ابتدا به منظور تعیین اثر کشندگی دو حشره‌کش فرموله شده تیمتوکسام و پرمیکارب بر شته سیاه باقلا، *A. fabae*، در طی ۲۴ ساعت، از طریق غوطه-وری برگ باقلا در غلظت‌های مختلف ترکیبات شیمیایی، آزمون‌های زیست‌سنجی انجام گرفت. سپس غلظت‌های زیرکشنده‌ای که باعث ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درصد مرگ و میر شته می‌شدند برای ارزیابی چگونگی تغییرات در

درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی پرورش داده می‌شد. به منظور حفظ جمعیت شته‌ها، هر دو تا سه روز یک بار، چند گیاه سالم و شاداب به اتاق رشد منتقل شده در اختیار شته‌ها قرار می‌گرفت.

حشره‌کش‌ها

دو ترکیب حشره‌کش پیریمیکارب (پریمور®، ۵۰٪ WP، گل سم گرگان) و تیمتوکسام (آکتارا®، ۲۵٪ WG، سینجنتا) برای آزمون‌ها مورد استفاده قرار گرفت. فرمولاسیون تجاری این دو حشره‌کش به ترتیب، از شرکت گل سم گرگان و اداره حفظ نباتات تهران تهیه شد.

تست زیست‌سنجی شته‌ها

زیست‌سنجی شته‌ها به روش تماس با باقیمانده خشک سم به جای مانده بر سطح برگ طی مدت زمان ۲۴ ساعت، با استفاده از شته‌های ماده بالغ بی بال ۲۴ ساعته، انجام شد. بدین منظور، پس از این که غلظت‌های بالا و پایین (کمتر از ۱۰ و بیش از ۹۰ درصد کشندگی) از فرمولاسیون‌های حشره‌کش طی آزمون‌های اولیه تعیین شدند، برای انجام آزمون‌های اصلی با استفاده از روش گفته شده در بالا، پنج غلظت از هر یک از فرمولاسیون‌های تجاری (تیمتوکسام، بین ۱۷/۵ تا ۷۵۰ میلی گرم ماده مؤثر بر لیتر و پیریمیکارب، ۰/۲۵ تا ۱۵ میکرولیتر ماده مؤثر در لیتر) در آب مقطر به عنوان حلال ساخته شد. برای آزمایش زیست‌سنجی، برگ‌های باقلا از گیاهان هم سن و از نواحی هم‌سانی از گیاهان از قسمت دم‌برگ بریده شدند. در آزمایشگاه در هر یک از غلظت‌های محلول‌های حشره‌کش، به مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور شده، در زیر هود به مدت یک ساعت خشک شدند. برگ‌ها در محیط آگار-آگار ۱/۲ درصد طوری قرار داده شدند که سطح پشتی آن‌ها رو به بالا باشد. پس از بستن آگار، شته‌های ماده بالغ هم‌سن (۲۴ ساعته) روی برگ‌ها مستقر شدند. آزمایش در سه تکرار و طی روزهای مختلف با ۲۰ حشره در هر تیمار انجام گرفت و مجموعاً برای هر

غلظت، ۶۰ حشره و نهایتاً برای هر یک از حشره‌کش‌ها، ۳۶۰ شته بالغ بدون بال مورد ارزیابی قرار گرفت.

به منظور هم سن کردن شته‌ها، تعداد بیش از ۱۰۰ شته ماده بالغ بدون بال به هر گلدان دارای گیاهان هم سن باقلا درون انکوباتور با دمای 27 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 70 ± 10 درصد و دوره نوری ۱۶:۸ ساعت منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت، این شته‌ها حذف شده و به پوره‌ها اجازه داده شد تا در اتاق رشد (دمای 23 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 70 ± 10 درصد و دوره نوری ۱۶:۸ ساعت) به بلوغ برسند. دمای بالاتر انکوباتور پوره‌زایی را تسریع می‌کرد و دمای پایین‌تر اتاق رشد مانع از مرگ و میر شته‌ها می‌شد. بدین ترتیب، شته‌های بالغ شش روزه برای آزمون‌های زیست‌سنجی مورد استفاده قرار گرفتند. آزمون در فاصله زمانی ۲۴ ساعت و مجدداً در انکوباتور با شرایط ثابت گفته شده در بالا انجام گرفت و شته‌هایی که بعد از این زمان با تحریک قلم موی نازک حرکت نمی‌کردند، مرده تلقی شدند.

تعیین فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا

پس از تعیین غلظت زیر کشنده، واحدهای آزمایشی به شیوه زیست‌سنجی آماده شدند و شته‌های بالغ هم سن، به روش گفته شده تحت تأثیر غلظت‌های زیرکشنده (LC_{10} , LC_{20} , LC_{30} , LC_{40} و LC_{50} برای شته) قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت افراد زنده مانده برای آزمون‌های بیوشیمی در ویال‌های جداگانه قرار داده شدند.

تعیین غلظت پروتئین

میزان پروتئین توسط روش بردفورد (Bradford, 1976) با استفاده از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد، در جذب نوری ۶۳۰ نانومتر تعیین شد.

سنجش آنزیم گلوکاتایون اس-ترانسفراز

هموژنایز افراد زنده در بافر تریس-HCL سرد ۰/۰۵ مولار با اسیدیته ۸ و سانتیفریژ در $10000g$ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس صورت گرفت

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی / دوره ۵ / شماره ۲ / پاییز و زمستان ۱۳۹۵

به این دو حشره‌کش مقاومت تقاطعی نشان دادند و به ترتیب LC_{50} برابر با ۱۰ و ۱۷۵/۲ داشتند (Kwon et al., 2009).

حشره‌کش‌های نئونیکوتینوئیدی مختلف، اثرات مختلفی بر شته‌ها داشتند. ضمن زیست سنجی به صورت قطره‌گذاری با میکرواپلیکاتور، LC_{50} دو کلون شته *Myzus persicae* تحت تأثیر ماده تکنیکال تیمتوکسام ۰/۶۵ و ۱۹/۷ میلی گرم در لیتر گزارش شد. هم‌چنین غلظت کشنده نیمی از جمعیت دوکلون این شته با ایمیداکلوپرید ۱/۱۳ و ۳۱/۱، با کلوتیانیدین ۰/۵۹ و ۱۷/۷۷ و با تیاکلوپرید ۰/۶۱ و ۱/۸، ۲۵ میلی گرم در لیتر بود (Puinean et al. 2010).

نتایج حاکی از ارزیابی اثرات دو حشره‌کش تیمتوکسام و پیریمیکارب بر آنزیم‌های سم‌زدای شته *A. fabae* نشان داد زمانی که آنزیم گلوکاتایون اس-ترانسفراز با سوبسترای CDNB اندازه‌گیری می‌شود، در شته *A. fabae* نوعی القای آنزیم با افزایش غلظت‌های زیرکشنده پیریمیکارب مشاهده می‌شود ($df=12$, $F=18/87$, $P=0/0001$) (شکل ۱A). هم‌چنین تیمتوکسام نیز در غلظت‌های بالاتر اثر القا کنندگی آنزیم را نشان می‌داد اما روند افزایش آنزیم خطی نبود ($df=12$, $F=9/15$, $P=0/0009$) (شکل ۱B). با این وجود اندازه‌گیری گلوکاتایون اس-ترانسفراز به وسیله سوبسترای DCNB داده قابل نتیجه‌گیری نشان نداد.

استفاده از سوبسترای مختلف در بسیاری مواقع فعالیت‌های متفاوتی از آنزیم را نشان می‌دهند. این موضوع به ویژه در ارتباط با سوبسترای DCNB در دو زنجیر تشخیص میزان فعالیت گلوکاتایون اس-ترانسفراز قابل تأمل‌تر بوده است (Hung et al. 1990; Yang et al., 2001). محققین با مقایسه برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های سم‌زدا در کفشدوزک شکارگر *Harmonia axyridis* و دو شته شکار آن، *Aphis citricola* و *Myzus malisuctus* دریافتند در تمامی گونه‌های تست شده فعالیت GST از طریق CDNB بسیار بیشتر از DCNB بوده است.

پایین‌تر از LC_{50} محاسبه شده برای تیمتوکسام بود، این موضوع پیریمیکارب را بیش از حشره‌کش دیگر به عنوان شته‌کش اختصاصی معرفی کرد. از سوی دیگر، شدت کشندگی پیریمیکارب نیز برای شته بالاتر از تیمتوکسام ارزیابی شد (جدول ۱).

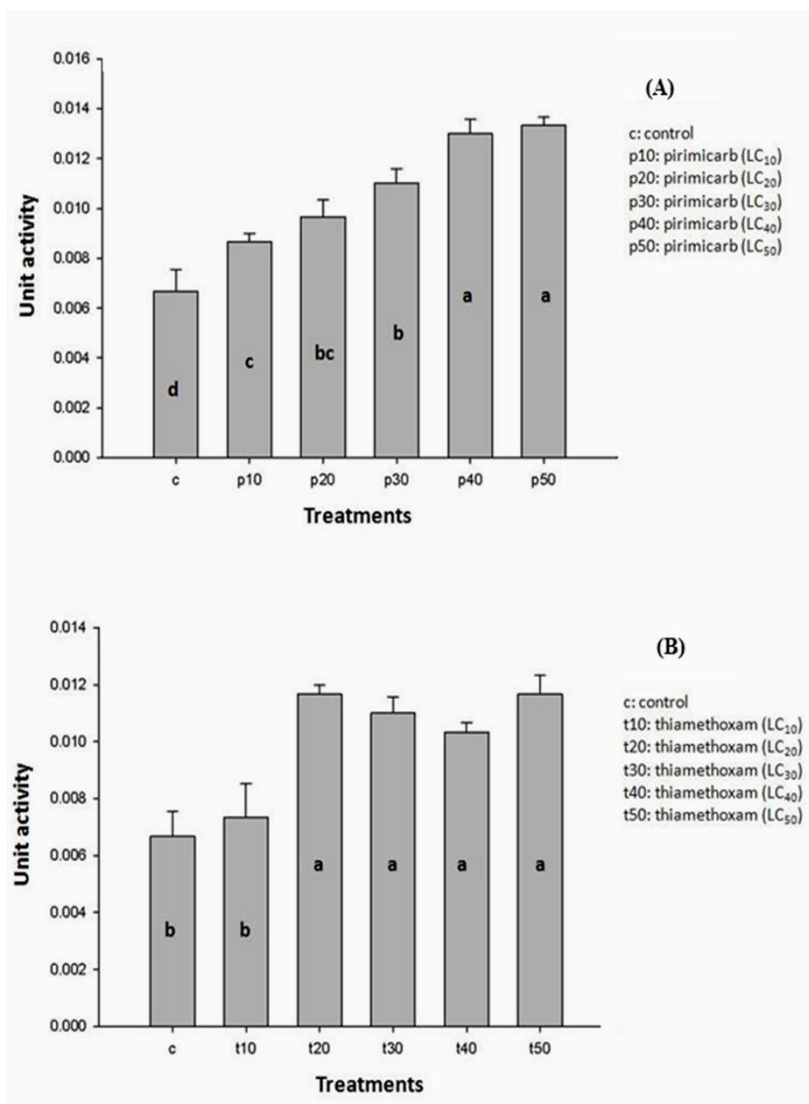
پیریمیکارب یک شته‌کش اختصاصی کاربامات با عملکرد سریع است که از طریق تماسی، خوراکی، بخار، و سیستم ریشه فعالیت می‌کند (Jutsum et al. 1988). مطالعات مختلفی مقایسه جمعیت‌های حساس و مقاوم گونه‌های مختلفی از شته‌ها به پیریمیکارب را نشان می‌دهد (Coon et al., 2009). هم‌چنین در آزمایشی، استرین‌هایی از شته *Myzus persicae* را به صورت دوره‌ای با غلظت LC_{30} فرمولاسیون پیریمیکارب به این آفت‌کش مقاوم کردند (Kwon et al. 2009). زیست سنجی باقیمانده آفت‌کش روی برگ در مدت زمان ۴۸ ساعت میزان LC_{50} برای استرین حساس را ۱۶/۵ پی‌ام نشان می‌داد و مقاومت استرین مقاوم ۱۳۱ برابر بیشتر بود که با توجه نوع فرمولاسیون پیریمیکارب (pirimicarb, 25% WP) و محاسبه میزان ماده تکنیکال، LC_{50} ۱/۴ برابر بیشتر از جمعیت حساس *Aphis fabae* در زیست سنجی ۲۴ ساعته در آزمایش ما بود. هم‌چنین شدت کشندگی در هر دو شته تقریباً قابل مقایسه بود ($2/58 \pm 0/42$ و $2/3 \pm 0/4$) $Slope \pm SE =$ به ترتیب در شته *Aphis fabae* و شته (*Myzus persicae*).

حساسیت شته‌های مختلف به نئونیکوتینوئیدها به وسیله محققان مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته است. میزان LD_{50} ایمیداکلوپرید را بر دو جمعیت شته *Myzus persicae* جمع‌آوری شده از رشت و کرج به ترتیب ۸/۵۶ و ۷/۸۰ نانوگرم ماده مؤثره به ازای هر حشره محاسبه کردند (Ghadamyari et al. 2008). در یک آزمایش مشابه، شته‌های *Myzus persicae* حساس، LC_{50} معادل ۱/۹ و ۳/۹ به فرمولاسیون ایمیداکلوپرید و استامپیرید (8% acetamiprid، 10% WP imidacloprid) داشتند. در حالی که شته‌های مقاوم به پیریمیکارب

جدول ۱- حساسیت ماده بالغ بدون بال شته سیاه باقلا، *A. fabae* به دو حشره کش تیامتوکسام و پیریمیکارب.

Table 1. Susceptibility of the apterous adult female of *A. fabae* to the insecticides, thiamethoxam and pirimicarb

$X^2(df)$	Slope $\pm$ SE	غلظت mg(ai)L ⁻¹ (95%CI) ⁻¹					تعداد	حشره کش
		LC ₁₀	LC ₂₀	LC ₃₀	LC ₄₀	LC ₅₀		
۲۱/۰۰ (۱۳)	۲/۵۸ $\pm$ ۰/۴۲	۰/۹۳ (۰/۲۳-۱/۶۴)	۱/۳۹ (۰/۲۳-۱/۱۹)	۱/۸۴ (۰/۷۸-۲/۷۱)	۲/۳۵ (۱/۱۷-۳/۲۹)	۲/۹۴ (۱/۷۱-۳/۹۹)	۳۶۰	پیریمیکارب
۱۲/۸۹ (۱۳)	۱/۴۰ $\pm$ ۰/۲۱	۱۳/۸۵ (۳/۹۱-۲۸/۲)	۲۸/۵۳ (۱۰/۷۷-۵۰/۴۴)	۴۸/۰۷ (۲۲/۱۱-۷۷/۵۶)	۷۵/۰۶ (۴۰/۲۶-۱۱۳/۷۰)	۱۱۳/۸۵ (۶۸/۹۴-۱۶۶/۲۱)	۳۶۰	تیامتوکسام



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف دو حشره کش پیریمیکارب (A) و تیامتوکسام (B) بر آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز شته *A. fabae* با استفاده از سوبسترای CDNB.

Figure 1. Effect of two insecticides, pirimicarb (A) and thiamethoxam (B) on the *A. fabae* Glutathione-s-transferase enzyme using CDNB as substrate.

در حقیقت، اتصال (conjugation) DCNB در هیچ یک از دو گونه *M. malisuctus* و *A. citricola* مشاهده نشد. هرچند، دلیل این عدم اتصال (conjugation) آشکار نگردید. مشابه با این بررسی، محققین گزارش کردند که فعالیت GST از طریق سوبسترای CDNB در تمامی حشرات تست شده بسیار بالاتر از DCNB بوده و هیچ اتصالی به سوبسترای DCNB در *Nilaparvata lugens* و *Laodelpha stiatellus* دیده نشده است (Hung et al. 1990). نیز محققین نشان دادند سوبسترای CDNB به وضوح تفاوت فعالیت آنزیم های GST را در کنه های پرورش یافته روی ذرت، لویا و خیار نشان می دهد (Yang et al. 2001). این روند افزایش فعالیت آنزیم هم سو با گذشت زمان صورت می گرفت. در مقابل، وقتی که DCNB به عنوان سوبسترا برای سنجش به کار رفت، تفاوتی در فعالیت GST در میان کنه های تارتن تغذیه شده با گیاهان مختلف دیده نشد.

تفاوت های موجود در میزان فعالیت آنزیم ها را هم چنین می توان در سایر انواع سوبستراها مشاهده کرد. به عنوان مثال، در یک بررسی، ضمن مقایسه جمعیت های مختلف پسپیل آسیایی مرکبات *Diaphorina citri* با جمعیت حساس آزمایشگاهی با استفاده از آلفا-نفتیل استات به عنوان سوبسترا تفاوت های آماری معنی داری مشاهده نکردند (Tiwari et al. 2011). با این وجود تفاوت ها ضمن استفاده از بتا-نفتیل استات چشم گیر بود. تعیین فعالیت های گلو تاتیون اس-ترانسفراز با سه سوبسترای CDNB، DCNB و DNIB در مراحل مختلف زندگی کفشدوزک *Adalia bipunctata* نیز حاکی از فعالیت های بسیار پایینی در ارتباط با DCNB بود، اما در ارتباط با دو سوبسترای دیگر سطوح بالاتری از آنزیم گلو تاتیون اس-ترانسفراز ارزیابی شد (Fransis et al. 2002).

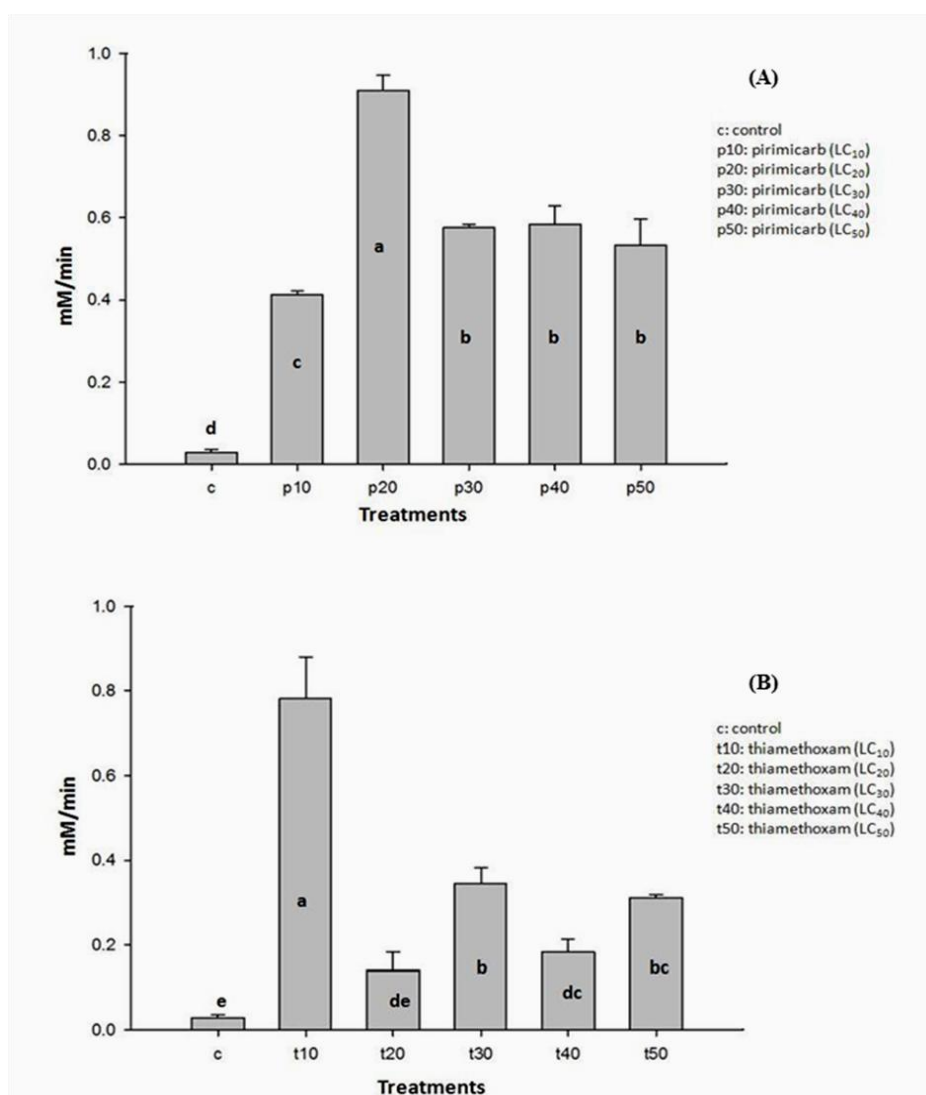
سیتوکروم مونوکسیژنازهای P450 سیستم متابولیکی مهمی هستند که افزون بر آنابولسم و کاتابولسم ترکیبات درون زاد شامل هورمون ها و فرمون ها، در سم زدایی یا فعال

سازی زنوبیوتیک ها نقش دارند (Brown et al., 2003). تأثیر حشره کش پیریمیکارب بر آنزیم سیتوکروم P450 شته *A. fabae* باعث افزایش القای آنزیمی شد و تفاوت معنی داری را بین تیمارهای مختلف به وجود آورد ($P < 0.0001$, $F = 63/62$, $df = 12$) (شکل ۲A). هم چنین تأثیر حشره کش تیمتوکسام نیز بر آنزیم سیتوکروم P450 شته سیاه باقلا افزایشی معنی دار را در تیمارهای مختلف نشان می داد ($P < 0.0001$, $F = 29/63$, $df = 12$) (شکل ۲B).

در آزمایش حاضر، غلظت های پایین تر تیمتوکسام و پیریمیکارب، القاگران مؤثرتری بر فعالیت P450 شته سیاه باقلا بودند (شکل ۲). در این ارتباط، دیوید و همکاران (David et al. 2006) نتایج مشابهی را ارائه کردند. ایشان گزارش کردند که لاروهای پشه *Aedes aegypti* که در معرض دز زیرکشنده مواد سمی برگ بوده اند در میزان فعالیت اتوکسی کومارین-او-داتیلاز آن ها افزایش دیده می شود. در واقع، با افزایش دز تا حداکثر پنج درصد که باعث مرگ و میر ۳۰ درصدی لاروی می شد، افزایش معنی داری در فعالیت های P450 لاروی دیده شد. در دزهای بالاتر مواد سمی برگ، فعالیت های P450 مجددا کاهش می یافت؛ به طوری که در دز ۱۰ درصد، که باعث مرگ و میر ۹۷ درصد لاروها می شد، میزان فعالیت P450 به سطحی معادل شاهد می رسید. این روند می تواند نشان دهد که هر موجود زنده دارای ظرفیت متابولیکی و حد تحمل ویژه ای در مواجهه با یک ترکیب زنوبیوتیک است و در حقیقت، واکنش موجود زنده در برابر دزهایی بالاتر از حد تحمل به صورت افزایش احتمال مرگ و میر بروز می کند و در میزان فعالیت های آنزیم های سم زدا تغییرات خاصی دیده نمی شود. شواهد مشخصی از بررسی ها بر روی بدن جانور و مطالعات کشت بافت موجود است که ثابت می کند آفت کش ها القای استرس اکسیدی می کنند. از سوی دیگر، بیومارکرهای در معرض قرار گیری (Biomarkers of Exposure) در سم شناسی مهم هستند، زیرا آن ها شاخص های مناسبی برای دزهایی که وارد بدن می شوند یا مقادیری از مواد شیمیایی که

نئونیکوتینوتیدی در غلظت‌های بسیار پایین (۱۰ درصد کشنده) می‌باشند. در حالی که گلوپتاتیون اس-ترانسفرازها به ویژه در ردیابی آلودگی ترکیبات کاربامات، فعالیتی وابسته به غلظت ترکیب دارند و با افزایش مقدار این ترکیبات، فعالیت آن‌ها افزایش پیدا می‌کند.

توسط بدن جذب می‌شوند، هستند. در بررسی حاضر، طی انجام آزمون‌های بیوشیمیایی، بر سنجش آنزیم‌های سم‌زدا (گلوپتاتیون اس-ترانسفرازها و سیتوکروم P₄₅₀) تکیه شد و مشخص شد که در شته *A. fabae* هر دو آنزیم‌های یاد شده این قابلیت را داشتند که به عنوان بیومارکر مورد توجه قرار گیرند. افزون بر این که مونواکسیژنازهای P₄₅₀ آنزیم‌های بسیار مناسبی در تشخیص آلودگی شته تحت تأثیر سموم کاربامات و



شکل ۲- تأثیر دو حشره کش پیریمیکارب (A) و تیامتوکسام (B) بر میزان فعالیت آنزیم سیتوکروم P₄₅₀ شته *Aphis fabae*

Figure 2. Effect of two insecticides, pirimicarb (A) and thiamethoxam (B) on the activity of *A. fabae* Cytochrome P₄₅₀ enzyme.

منابع

- Adams M.D, Celniker S.E, Holt R.A, Evans C.A, Gocayne J.D, Amanatides P.G, Scherer S.E, Li P.W, Hoskins R.A, Galle R.F. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science 287: 2185.
- Balabaskaran S, Chuen SS. And Muniandy S. 1989. Glutathione s-transferase from the diamond back moth (*Plutella xylostella* linnaeus). Insect Biochemistry 19: 435-443.
- Basij M, Talebi K, Ghadamyari M, Hosseininaveh V, Salami SA. 2016. Status of resistance of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) to Neonicotinoids in Iran and Detoxification by Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases. Neotropical Entomology 25(5): 1-10.
- Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Brown D., Zhang L, Wen Z., And Scott J.G. 2000. Induction of P450 Monooxygenases in the German cockroach, *Blattella germanica* L. Arch. Insect Biochemistry Physiology 2003: 53:119-124.
- CAB. 2000. International, Crop Protection Compendium, Global Module, 2nd edn. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Chandrasena D, Difonzo Ch, and Byrne A. 2011. An Aphid-Dip Bioassay to Evaluate Susceptibility of Soybean Aphid (Hemiptera: Aphididae) to Pyrethroid, Organophosphate, and Neonicotinoid Insecticides. Journal Economic Entomology 104(4): 1357-1363.
- Cloyd R.A. and Bethke J.A. 2011. Impact of neonicotinoid insecticides on natural enemies in greenhouse and interiorscape environments. Pest Management Science 67: 3-9.
- Coon M.J. Vaz A.D. Bestervelt L.L. 1996. Peroxidative reactions of diversozymes. Fedration of American Societies for Experimental Biology 10: 428-434.
- David J.P, Boyer S, Mesneau A, Ball A, Ranson H. And Dauphin-Villemant C. 2006. Involvement of cytochrome P450 monooxygenases in the response of mosquito larvae to dietary plant xenobiotics. Insect Biochemistry Molocular Biology 36:410-420.
- Esmaili M, Mirkarimi A.A, Azmayesh Fard P. 1998. Agriculture Entomology. Tehran University Publication (In Farsi with English Abstract).
- Feyereisen R. 1995. Molecular biology of insecticide resistance. Toxicology Letter 82/83: 83-90.
- Feyereisen R. 2006. Evolution of insect P450. Biochemistry Society Transaction 34: 1252-1255.
- Feyereisen R. 2015. Insect P450 inhibitors and insecticides: challenges and opportunities. Pest Management Science 71(6): 793-800.
- Francis F. Haubruge E. And Dierick P. 2002. Glutathione S-Transferase Isoenzymes in the Two-Spot Ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). Archive Insect Biochemistry Physiology 49:158-166.
- Gerami Sh, and Heidari A. 2013. Effect of Different Bioassay Methods on Enzymatic Characteristics of Cotton Aphid, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). Journal of Agricultural Science and Technology 3: 819-824.
- Ghadamyari M, Talebi K, Mizuno H. & Kono Y. 2008. Oxydemeton-Methyl Resistance, Mechanisms, and Associated Fitness Cost in Green Peach Aphids (Hemiptera: Aphididae). Journal of Economic Entomology 101: 1432-1438.
- Hasanshahi Gh, Abbasipour H, Jahan F, Askarianzadeh A, Karimi J, and Rastegar F. 2016. Fumigant toxicity and nymph production deterrence effect of three essential oils against two aphid species in the laboratory condition. Journal of Essential Oil Bearing Plants 19 (3): 706 – 711.
- Hayes J.D, And Pulford D.J. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Biochemistry Molocular Biology 30: 445-600.
- Ho T.H. 1965. The life history of the diamond-black moth in Malaya. Diversity of agriculture Bulletin 188: 26.
- Hung C.F, Kao CH, Liu C.C, Lin J.G. And Sun C.N. 1990. Detoxifying enzymes of selected insect species with chewing and sucking habits. Journal of Economic Entomology 83: 361-365.
- Hyne R.V. And Maher W.A. 2003. Invertebrate biomarkers. Links to toxicities that predict population decline. Ecotoxicology Environmental Safety 54: 366-374.
- Jalali M.A, Leeuwen T.V, Tirry L. And De Clercq P. 2009. Toxicity of selected insecticides to the two-spot ladybird *Adalia bipunctata*. Phytoparasitica 37: 323-326.
- James DG. 2003. Pesticide Susceptibility of Two Coccinellids (*Stethorus punctum* picipes and *Harmonia axyridis*) Important in Biological Control of Mites and Aphids in Washington. Biocontrol Science Technology 13:253-259.
- Jutsum A.R, Franz J.M, Deacon J.W, Payne C.C, Lewis T, Paterson R.R.M, Waage J.K. And Van Emden HF. 1998. Commercial application of biological control: status and prospects. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B 318: 357-373.
- Khanjani M. 2004. Field Crop Pest in Iran. Bu-Ali Sina University Publication (In Farsi with English Abstract).
- Kwon D.H, Choi B.R, Lee S.W, Clark J.M. & Lee S.H. 2009. Characterization of carboxylesterase-mediated pirimicarb resistance in *Myzus persicae*. Pesticide Biochemistry and Physiology 93: 120-126.
- Martin T, Chandre F, Ochou O.G, Vaissayre M, Fournierd D. 2002. Pyrethroid resistance mechanisms in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. Pesticide Biochemistry Physiology 74: 17-26.
- Mullin C.A, Croft B.A, Strickler K, Matsumura F. and Miller J.R. 1982. Detoxification enzyme differences between a herbivorous and predatory mite. Science 217: 1270-1272.
- Nelson D.R, Koymans L, Kamataki T, Stegeman J.J, Feyereisen R, Waxman D.J, Waterman M.R, Gotoh O, Coon M.J, Estabrook R.W, Gunsalus I.C, Nebert D.W. 1996. 450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. Pharmacogenetics 6:1-42.

- Oppenoorth F.J. 1985.** Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In And Gilbert LJ (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* Kerkut GS. Pergamon, Oxford 12: 731-773.
- Puinean A.M, Foster S.P, Oliphant L, Denholm I, Field L.M., Millar N.S, Williamson M.S, And Bass C. 2010.** Amplification of a Cytochrome P450 Gene Is Associated with Resistance to Neonicotinoid Insecticides in the Aphid *Myzus persicae*. *PLoS Genetics* 6: 1-11.
- Ranson H, Rossiter L, Ortell F, Jensen B, Wang X, Roth C.W, Collins F.H. And Hemingway J. 2001.** Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochemistry Journal* 359: 295-304.
- Rendic S and DiCarlo F.J. 1997.** Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metabolism review.* 29: 413-580.
- Robertson, J.L., Russell, R.M., Preisler, H.K., & Savin, N.E. 2007.** *Bioassays with Arthropods*. Second Edition, Taylor and Francis, Boca Raton London New York, pp 199.
- Ruberson J.R, Nemoto H. And Hirose Y. 1998.** Pesticides and conservation of natural enemies in pest management, In: Barbosa P. (Ed.), *Conservation Biological Control*, Academic Press, New York 207-220.
- Sánchez-Bayo F, Goka K. 2014.** Pesticide residues and bees – a risk assessment. *PLoS One* 9:e94482.
- SAS Institute, SAS/STAT. 2003.** *Guide for Personal Computers*. Ver. 6.12. SAS Institute, Cary, NC.
- Stark J.D, Sugayama R.L, and Kovaleski A. 2007.** Why demographic and modeling approaches should be adopted for estimating the effects of pesticides on Biocontrol agents. *BioControl* 52: 365-374.
- Stumpf N. And Nauen R. 2002.** Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Pesticide Biochemistry Physiology* 72: 111-121.
- Sulaiman S, Ndula M, Riveron J.M, Irving H and Wondji Ch. 2016.** The P450 CYP6Z1 confers carbamate/pyrethroid crossresistance in a major African malaria vector beside a novel carbamate-insensitive N485I acetylcholinesterase-1 mutation. *Molecular Ecology* 25(14): 3436-3452.
- Syngenta, Catalogo. 2004.** Syngenta Crop Protection. Syngenta, LisboaPortugal.
- Tiwari S, Mann R.S, Rogers M.E. And Stelinski L.L. 2011.** Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. *Pest Management Society* 2011: 67: 1258-1268.
- Vontas J.G, Small G.J, Hemingway J. 2001.** Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochemistry Journal* 357: 65-72.
- Wang K.Y, Liu T.X, Yu C.H, Jiang X.Y. And Yi M.Q. 2002.** Resistance of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) to fenvalerate and imidacloprid and activities of detoxification enzymes on cotton and cucumber. *Journal of Economic Entomology* 2002: 95: 407-413.
- Wei SH, Clark AG, And Syvanen M. 2001.** Identification and cloning of a key insecticide metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochemistry Molecular Biology* 31: 1145-1153.
- Wool D, Noiman S, Manheim O. And Cohen E. 1982.** Malathion resistance in *Tribolium strains* (Coleoptera, Tenebrionidae) and their hybrids inheritance patterns and possible enzymatic mechanisms. *Biochemistry Genetic* 20: 621-636.
- Yang TC, Chi H. 2006.** Life tables and development of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) at different temperatures. *Journal of Economic Entomology* 99: 691-698.
- Yang X, Margolies DC, Zhu KY. 2001.** And Buschman LL: Host plant-induced changes in detoxification enzymes and susceptibility to pesticides in the two spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology* 94: 381-387.
- Zuo Y, Wang K, Zhang M, Peng X, Jaime C. Chen M. 2016.** Regional susceptibilities of *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) to ten insecticides. *Florida Entomologist* 99(2): 269-275.